

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij – Nutricionizam

Ivana Holetić

6734/N

POLIFENOLI U NADZEMNOM DIJELU BILJKE *Urtica dioica* L.

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Začinsko i aromatsko bilje

Mentor: prof.dr.sc. Verica Dragović - Uzelac

Zagreb, 2017.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij - Nutricionizam
Zavod za prehrambeno – tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za procese konzerviranja i preradu voća i povrća**

POLIFENOLI U NADZEMNOM DIJELU BILJKE *Urtica dioica* L.

Ivana Holetić, 6734/N

Sažetak: Cilj ovog rada bio je u uzorcima koprive s različitih područja (Sredozemno, Egejsko, Marmara i Crno more) te u različitim dijelovima biljke (u cijeloj biljci te u stabljici i listu) odrediti ukupni udio vlage, ukupne i pojedinačne fenolne spojeve te antioksidacijski kapacitet. Rezultati su pokazali da su svi istraživani parametri bili različiti u različitim dijelovima biljke. Najveći udio vlage određen je u uzorcima biljke i stabljike s Egejskog mora ($88,84 \pm 0,18\%$ te $91,17 \pm 0,30\%$), a u listovima biljke sa Sredozemnog mora ($86,63 \pm 0,02\%$). Najveći udio fenolnih spojeva određen je u u cijeloj biljci ($440,49 \pm 16,06$ mgGAE/gDM) i u stabljici koprive sa Crnog mora ($160,72 \pm 3,47$ mgGAE/gDM). Najzastupljeniji pojedinačni fenolni spojevi u stabljici bili su kafeinska i klorogenska kiselina te rutin, a u listovima siringinska i elaginska te kvercetin. Vrijednost antioksidacijskog kapaciteta bila je najniža u stabljici, dok je u listovima i cijeloj biljci bila veća.

Ključne riječi: *U. dioica* L., polifenoli, antioksidacijski kapacitet, ekstrakcija otapalima

Rad sadrži: 30 stranica, 8 slika, 5 tablica, 51 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: *prof.dr.sc. Verica Dragović-Uzelac*

Rad predan: lipanj, 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate studies Nutrition
Department of Food Engineering
Laboratory for Technology of Fruits and Vegetables Preservation and Processing

POLYPHENOLS IN ABOVE-GROUND PARTS OF PLANT *Urtica dioica* L.

Ivana Holetić, 6734/N

Abstract: The aim of this study was to determine total moisture content, total and individual phenolic compounds and antioxidant capacity of nettle samples (whole plant, stem and leaves) from different areas (Mediterranean Sea, Aegean Sea, Black Sea and Marmara Sea). All researched parameters differ depending on the parts of the plant. The highest moisture content was determined in the stem of the plant from Aegean Sea ($88,84 \pm 0,18\%$ to $91,17 \pm 0,30\%$) and in the leaves of the plant from Mediterranean Sea ($86,63 \pm 0,02\%$). The highest phenolic compound yield was determined in the whole plant ($440,49 \pm 16,06$ mgGAE/gDM) and in the nettle stem ($160,72 \pm 3,47$ mgGAE/gDM) from Black Sea. The most common individual phenolic compounds in the stem were caffeic acid, chlorogenic acid and rutin while in the leaves there was high amount of syringic acid, ellagic acid and quercetin. The antioxidant capacity was lowest in the stem and higher in the whole plant and leaves.

Keywords: *U. dioica* L., polyphenols, antioxidant capacity, solvent extraction

Thesis contains: 30 pages, 8 figures, 5 tables, 51 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of

Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000

Zagreb

Mentor: *Ph.D. Verica Dragović – Uzelac, Full Professor*

Thesis delivered: June, 2017.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Kopriva	2
2.2. Kemijski sastav	3
2.2.1. Fenolni spojevi	4
Fenolne kiseline	4
Flavonoidi	5
2.2.2. Karotenoidi	6
2.2.3. Klorofil	8
2.3. Metode ekstrakcije	9
2.3.1. Ekstrakcija otapalima	9
Uvjeti ekstrakcije	10
2.3.2. Ekstrakcija ultrazvukom	13
2.3.2.1. Mehanizam i djelovanje ultrazvuka	13
2.3.2.2. Kavitacija	14
2.3.2.3. Ekstrakcija ultrazvukom	15
2.3.3. Ekstrakcija mikrovalovima	15
2.3.3.1. Mehanizam mikrovalnog zagrijavanja	15
2.3.3.2. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE)	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. MATERIJALI	18
3.1.1. Uzorci koprive	18
3.1.2. Priprema uzoraka i ekstrakcija	18
3.1.3. Kemikalije i standardi	18
3.2. METODE	19
3.2.1. Određivanje udjela vlage	19
3.2.2. Određivanje ukupnog udijela fenolnih spojeva	19
3.2.3. Određivanje antioksidativnog kapaciteta DPPH metodom	20

3.2.4 HPLC analiza fenolnih spojeva	20
4. REZULTATI.....	21
5. RASPRAVA.....	24
6. ZAKLJUČAK.....	26
7. LITERATURA	27

1. UVOD

Urtica dioica L. je višegodišnja zeljasta biljka koja se može koristiti kao čaj, za jelo, gnojivo, ili njegu kose (Grlić, 1990.). Biljka sadrži 2,5% masti, 7% ugljikohidrata te 18% proteina, a uz obilje vitamina i minerala bogata je i fitosterolima, lecitinom, taninima i fenolima. Najzastupljeniji fenolni spojevi koprive su kafeinska i klorogenska kiselina, fenil propan, skopoletin (Otles i sur., 2012.; Bucar i sur., 2006.). Zbog sastava bioaktivnih spojeva kopriva je medicinski vrlo važna biljka koja ima antikancerogeno, insekticidno, protuupalno i antioksidativno djelovanje.

Udio i sastav djelatnih tvari u koprivi razlikuje se ovisno o dijelu biljke. Stabljika i listovi koprive bogati su organskim kiselinama, vitaminima i mineralima, a kao najvažnije komponente ističu se polifenoli (Bhuwan i sur., 2014.). Polifenoli čine široko rasprostranjenu skupinu bioaktivnih spojeva koji se međusobno razlikuju po kemijskoj strukturi i svojstvima. Od fenolnih spojeva koprive najznačajniju su fenilpropani, kafeinska i klorogenska kiselina te skopoletin (Bucar i sur., 2006.). Za učinkovitu ekstrakciju polifenola važno odabrati optimalne parametre i metode ekstrakcije. Jedan od najčešće korištenih postupaka ekstrakcije polifenola je klasična ekstrakcija primjenom organskih otapala (najčešće vodene otopine alkohola), ali sve više se istražuju mogućnosti primjene novih tehnika poput ultrazvučne i mikrovalne ekstrakcije, ekstrakcije primjenom visokog tlaka, ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku i sl.. Ekstrakcija ovisi o brojnim faktorima poput temperature, vremena, vrste otapala za ekstrakciju te drugim parametrima ovisno o postupku ekstrakcije. Cilj ekstrakcije neovisno o primjenjenoj metodi je ostvariti što veći prinos fenola uz što manju upotrebu ekstrakcijskog otapala, kroz kraće vrijeme.

Svrha ovog rada je u uzorcima koprive s različitih područja uzgoja te u različitim dijelovima biljke (u cijeloj biljci te u stabljici i listu) odrediti ukupni udio vlage, ukupne i pojedinačne fenolne spojeve te antioksidacijski kapacitet.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KOPRIVA

Velika kopriva, *Urtica dioica* L., pripada carstvu *Plantae*, koljenu *Magnoliophyta*, razredu *Magnoliopsida*, redu *Urticales*, porodici *Urticaceae*, rodu *Urtica*.

Kopriva je dvodomna zeljasta višegodišnja biljka koja raste do visine od 1 do 2 m. Ima široko razgranate rizome i vriježe koji su jarko žute boje. Takve boje je i višegodišnji korijen. Listovi su zelene boje te srcolikog oblika s nazubljenim rubovima. Dužine su od 3 do 15 cm te su smješteni nasuprotno na čvrstoj i uspravnoj stabljici. Listovi i stabljika su prekriveni sitnim dlačicama. Postoje dvije vrste dlačica - one koje "ne peku" i one koje "peku" (Asgarpanah i sur., 2012.). Trihomi se prilikom dodira lome te se pretvaraju u male iglice koje se potom zabijaju u kožu i ispuštaju smjesu kemijskih spojeva od kojih su najvažniji acetilkolin, histamin, 5-hidroksitriptamin (serotonin), moroidin i mravlja kiselina (Greenberg, 2003.). Nakon dodira s ljudskom kožom djeluje kao iritans izazivajući bol, plikove i osjećaj peckanja koji mogu trajati čak do 12 sati (Oliver i sur., 1991.). Kuhanjem u vreloj vodi gube se iritirajuća svojstva što nam omogućava da jedemo mlade izdanke koprive. Cvjetovi su organizirani u obliku cvata i nalaze se u pazusištu listova, mali su i neugledni te mogu biti zelenkaste ili smeđe boje. Muški cvjetovi sadrže samo prašnike, dok ženski imaju samo tučak ili organe odgovorne za proizvodnju sjemena (Zargari, 1988.).

Kopriva je rasprostranjena diljem umjerene i tropske klime te raste u gotovo svim područjima svijeta (Krystofova i sur., 2010.). Još od antičkih dana kopriva se smatra jednom od najvažnijih biljaka u narodnoj medicini na području Europe. Koristila se kao diuretik te u liječenju artritisa i reume.

Danas je kopriva medicinski vrlo važna biljka i sastavni dio ljudske prehrane zbog bogatog sastava minerala, vitamina, klorofila, aminokiselina, lecitina, karotenoida. Mnogi kemijski spojevi, kao što su flavonoidi, tanini i steroli, izolirani su iz različitih dijelova biljke (Krystofova i sur., 2010.). Navedenim skupinama spojeva pripisuju se brojni pozitivni utjecaji kao što je antioksidativno (Mavi i sur., 2004.), protuupalno, antiulcerozno (Gulcin i sur., 2004.), protuvirusno (Krystofova i sur., 2010.), antikancerogeno (Koch, 2001.), protubakterijsko, antifunglano (Meepagala i sur., 2005.), antiandrogeno (Khouri i sur., 2005.) i insekticidno (Barbosa i sur., 2011.) djelovanje.



Slika 1 *Urtica dioica* (Asgarpanah i sur., 2012.)



Slika 2 *Urtica dioica* – trihomi (Asgarpanah i sur., 2012.)

2.2. KEMIJSKI SASTAV

Kopriva je bogat izvor brojnih bioaktivnih spojeva te sadrži: aglutinin, lektin, koproporfin, acetofenon, alkaloid, lecitin, violaksantin, ksantofil, klorofil, stigmasterol, terpene, klorogensku kiselinu, kafeinsku kiselinu, kumarinsku kiselinu, lignan, kemferol, kolin, histamin, serotonin, acetilkolin, mravlju kiselinu, maslačnu kiselinu, karbonatnu kiselinu, pantotensku kiselinu, linolnu i linolensku kiselinu, palmitinsku kiselinu i jantarnu kiselinu.

Kopriva također sadrži 2,5 % masti, 14-17 % albumina i 18 % proteina u suhoj tvari. U jednom kilogramu svježe koprive nalazi se 130 mg vitamina C, 730 mg karotena i oksalata. Trihomi sadrže mravlju kiselinu, histamin i acetilkolin. Listovi koprive sadrže provitamin A, vitamin B1, K, ksantofil i sistosterin. Pepeo sadrži 6,3 % željezo (III) oksida, kalija, kalcija i silicija (Otles i Yalcin, 2012.).

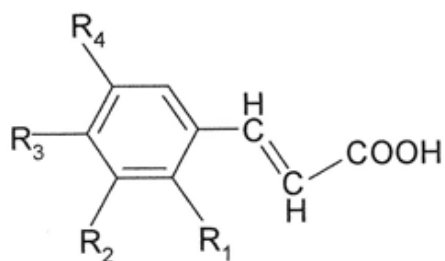
2.2.1. Fenolni spojevi

Polifenolni spojevi jedna su od značajnijih skupina bioaktivnih spojeva koprive, a do danas je u različitim biljnim izvorima identificirano više od 8 000 različitih polifenolnih spojeva od jednostavnih molekula kao što su fenolne kiseline do složenijih struktura kao što su tanini. To su spojevi koji sadrže jedan ili više aromatskih prstena na koje su vezane jedna ili više hidroksilnih skupina (Dai i Mumper, 2010). Osnovna podjela polifenola je na fenolne kiseline (hidroksicimetne i hidroksibenzojeve), flavonoide (antocijanini, flavonoli, flavanoli, flavoni), tanine (kondenzirani i hidrolizirani) i ostale polifenolne spojeve kao što su kumarini i lignani (Naczki i Shahidi, 2006).

Fenolne kiseline

Fenolne kiseline čine oko trećinu fenolnih spojeva prisutnih u biljkama, a prisutne su u slobodnom ili vezanom obliku. U prirodi se rijetko nalaze u slobodnom obliku, najčešće dolaze u konjugiranim oblicima te kao esteri (Macheix i sur., 1990.). Spadaju u neflavonoidne polifenolne spojeve koji se s obzirom na strukturu mogu podijeliti na dva glavna razreda: derivate hidroksicimetne (C3-C6) kiseline i hidroksibenzojeve (C1-C6) (Tsao, 2010.) (Slike 3 i 4). U derivate hidroksibenzojeve kiseline pripada galna, *p*-hidroksibenzojeva, siriginska i vanilinska kiselina, a u derivate hidroksicimetne *p*-kumarinska, kafeinska, ferulinska i sinapinska kiselina.

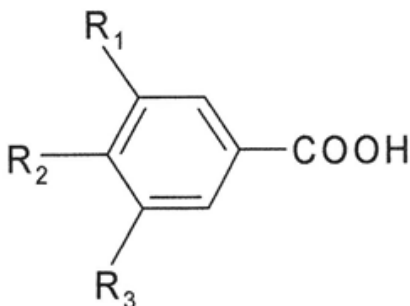
Od fenolnih spojeva u koprivi su prisutni: fenilpropani, kafeinska i klorogenska kiselina te skopoletin (Bucar i sur., 2006.).



HIDROKSICIMETNE KISELINE:

1.ferulinska	$R_1=R_2=R_4=H$
$R_3=OH$	
$R_4=OCH_3$	
2.p- kumarinska	$R_1=R_2=H$
$R_3=OH$	
3.kava	$R_1=R_2=H$
$R_3=R_4=OH$	
4.sinapinska	$R_1=H$
$R_3=OH$	

Slika 3 Derivati hidroksicimetne kiseline (Macheix i sur., 1990.)



HIDROKSIBENZOJEVE KISELINE

1.galna	$R_1=R_2=R_3=OH$
2.protokatehinska	$R_1=H$
	$R_2=R_3=OH$
3.vanilinska	$R_1=H$
	$R_2=OH$
	$R_3=OCH_3$
4.siringinska	$R_2=OH$
	$R_1=R_3=OCH_3$

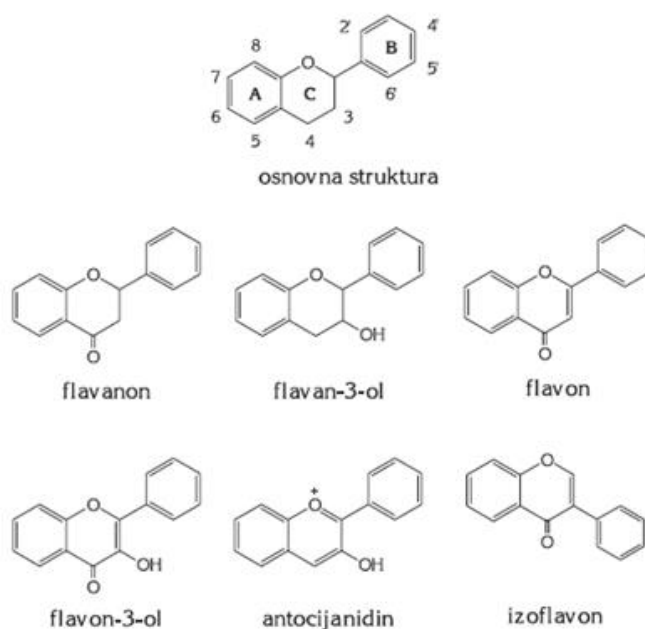
Slika 4 Derivati hidroksibenzojeve kiseline (Robards i sur., 1999.)

Flavonoidi

Flavonoidi su spojevi čiju osnovnu strukturu čini difenilpropanski kostur C₁₅(C₆-C₃-C₆) u kojem su dva benzenska prstena (**A** i **B**) povezana piranskim prstenom **C** koji sadrži kisik. (Slika 5). Različiti razredi flavonoida razlikuju se po stupnju oksidacije i supstituciji **C** prstena, dok se pojedinačni spojevi u razredu razlikuju prema supstituciji prstenova **A** i **B** (Kumar i sur., 2013.).

Prema nomenklaturi, osnova struktura flavonoida je kemijski spoj difenilpropan iz kojeg gubitkom vode i zatvaranjem C prstena nastaje flavan, a iz njega se izvodi određeni broj osnovnih struktura flavonoida: flavanoni, flavan-3-oli, flavoni, antocijanidini i izoflavoni. Neki se od njih mogu smatrati derivatima benzo- γ -pirona ili benzo- γ -pirana. Navedeni spojevi mogu biti hidroksilirani, metoksilirani i glikozidirani s monosaharidima ili oligosaharidima, a često sadrže i acilne skupine na različitim položajima osnovne flavonoidne strukture ili glikozidnog dijela. Kod flavonoida također postoji i velika sklonost umrežavanju i polimerizaciji (npr. tanini) (Kazazić, 2004.).

Od flavonoida u koprivi su prisutni: kampferol, izoramnetin, kvercetin, izokvercitrin, astragalin i rutin (Ellnain Wojtaszek i sur., 1986.)



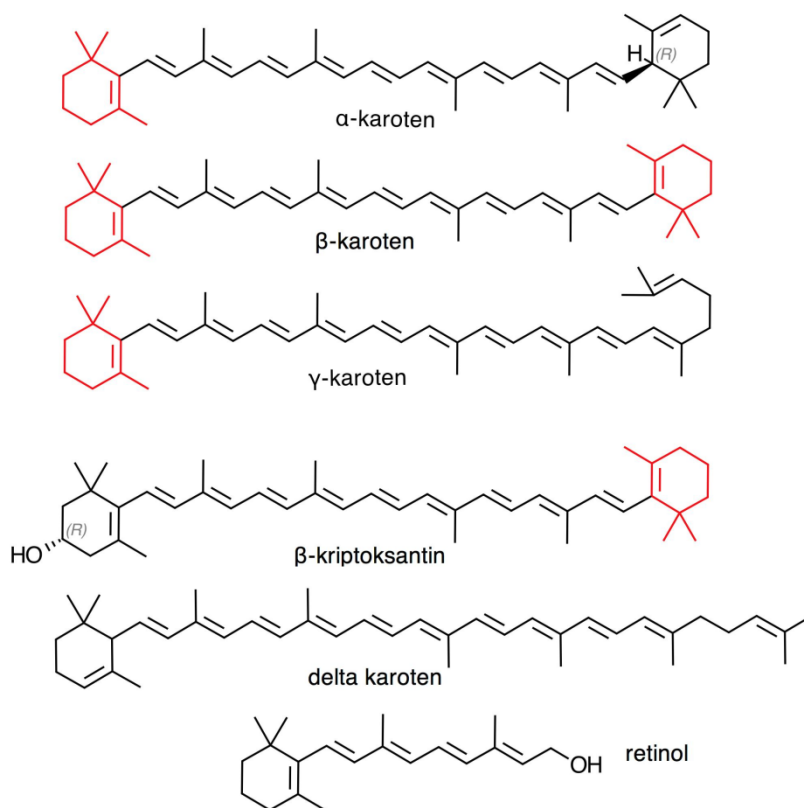
Slika 5 Osnovna struktura i skupine flavonoida (Kazazić, 2004.)

2.2.2. Karotenoidi

Karotenoidi su podjeljeni u karotene i njihove oksidirane derivate (ksantofili), a ugljikov kostur čine izoprenske jedinice (Liu, 2004) (slika 6). Procjenjuje se da je više od 600 različitih karotenoida, koji su izolirani i identificirani žute, narančaste i crvene boje i prisutni su u velikom broju voća, povrća, cjelovitih žitarica i drugih biljaka. Karotenoidi su dobili značajnu pozornost

zbog njihovih jedinstvenih fizioloških funkcija kao što su provitaminski i antioksidativni učinci. β -karoten i likopen su primjeri cikličke i acikličke strukture karotenoida.

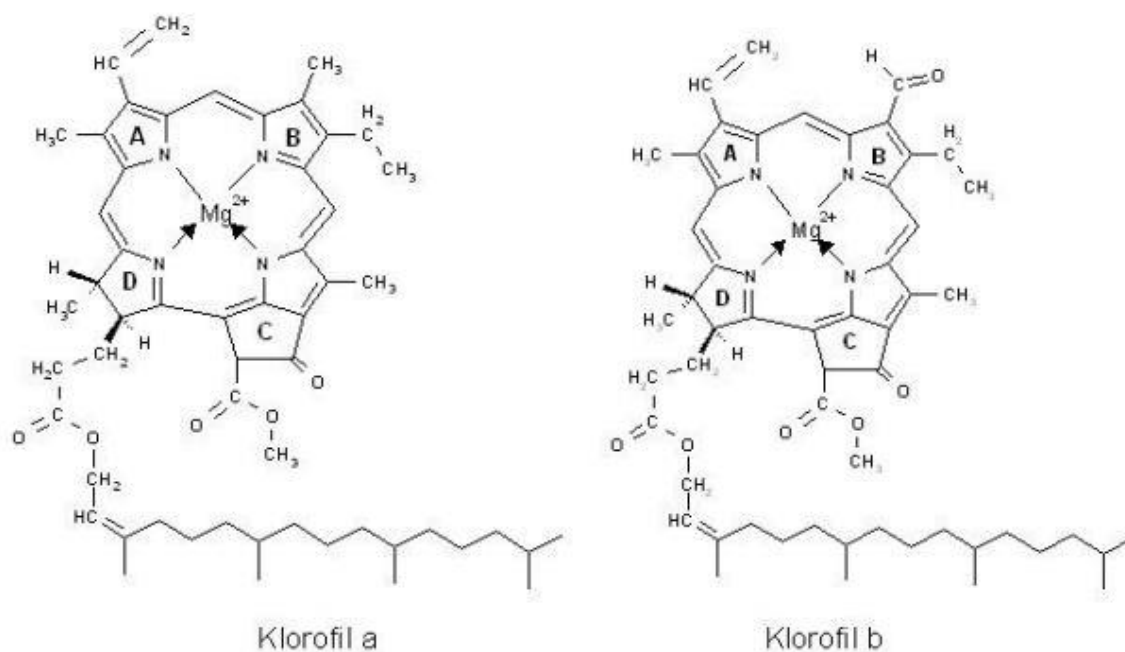
Karotenoidi su prije svega prisutni u *trans* obliku u prirodi. Središnji dio molekule je dugi niz konjugiranih dvostrukih veza. β -karoten, α -karoten, i β -kriptoksantin imaju provitaminsko djelovanje i mogu se prevesti u retinol (vitamin A) nakon metaboliziranja. Zeaksantin i lutein su karotenoidi bitni za makularnu regiju (žuta pjega) u mrežnici oka kod ljudi. Dijeta bogata zeaksantinom i luteinom je povezana sa smanjenim rizikom od razvoja katarakte i makularne degeneracije. Voće i povrće narančaste i žute boje (mrkva, bundeva, papaja, slatki krumpir...), bogati su izvor β -karotena. Tamno zeleno lisnato povrće (špinat, kelj, kupus, brokula...), bogat su izvor luteina i zeaksantina. Karotenoidi igraju bitnu ulogu u fotosintezi i imaju ulogu foto-zaštite u biljkama. Astaksantin, zeaksantin, lutein vežu slobodne radikale zbog jedinstvenog kraja funkcionalne skupine. Od karotenoida, u koprivi su prisutni: β – karoten, hidroksi- β -karoten, lutoksantin, lutein epoksid i violaksantin (Ellnain Wojtaszek i sur., 1986.).



Slika 6 Karotenoidi (Fiedor i sur., 2014.)

2.2.3. Klorofil

Klorofili su pigmenti zaslužni za zelenu boju biljaka, ali i najvažniji su spojevi na zemlji zbog svoje značajne uloge u apsorpciji i prijenosu svjetlosne energije u fotosintezi (Willows, 2004.). Kemijski gledano, klorofili su esteri dikarbonske kiseline, klorofilina i alkohola fitola (Slika 7). Osnovna građevna jedinica je porfirinski prsten s magnezijem u središtu na koji su vezana četiri pirolova prstena. Na porfirinsku jezgru, koja je hidrofilna, vezan je fitolni rep, koji je hidrofoban i lipofilan. Klorofili *a* i *b* najvažnije su skupine klorofila u biljkama, kemijski su srodni oblici te imaju karakterističnu zelenu boju zbog apsorpcije plavog i crvenog svjetla, s tim da je klorofil *a* modrozelen, a klorofil *b* žutozelen. Njihov kvantitativni odnos otprilike iznosi 3:1. Razlika u strukturi klorofila *a* i *b* vidljiva je na trećem (III) pirolnom prstenu. Klorofil *a* na toj poziciji ima metilnu skupinu ($-\text{CH}_3$), dok je kod klorofila *b* to aldehidna skupina ($-\text{CHO}$) (Von Wettstein i sur., 1995.). Klorofil *a* je primarni fotosintetski pigment jer se nalazi u reakcijskom središtu fotosistema i omogućuje pretvorbu svjetlosne energije u kemijsku, dok u sekundarne metabolite zbog pomoćne i zaštitne uloge, ubrajamo sve ostale klorofile i druge fotosintetske pigmente (Taiz i Zeiger, 2010). Klorofili imaju anti-mutagenu i antioksidacijsku aktivnost zbog mogućnosti prekidanja reakcije radikala uzrokovane autooksidacijom putem mehanizma kojemu je vodik donor (Ferruzzi i sur., 2002.).



Slika 7 Klorofil *a* i *b* (keminfo.pef.uni-lj.si)

2.3. METODE EKSTRAKCIJE

2.3.1. Ekstrakcija otapalima

Ekstrakcija je postupak potpunog ili djelomičnog odjeljivanja smjese tvari koje imaju nejednaku topivost u različitim otapalima. Ona je općenito prvi korak u izolaciji ciljanih skupina spojeva iz biljnih materijala. Ekstrakcije otapalima najčešće su korišteni postupci za pripremu ekstrakata iz biljnog materijala zbog svoje jednostavnosti korištenja, učinkovitosti i široke primjene (Dai i Mumper, 2010.). Ekstrakcija polifenolnih spojeva zahtjevnija je zbog njihove kemijske strukture i njihovih interakcija s drugim spojevima. Sastav i struktura polifenolnih spojeva koji se izdvajaju određuju uvjete ekstrakcije.

Najvažniji čimbenici koji utječu na ekstrakciju polifenolnih spojeva iz biljnih materijala su (Takeuchi i sur., 2009.):

- otapalo
- temperatura

- vrijeme kontakta
- omjer otapala i otopljene tvari
- veličina čestica i
- pH

Ekstrakcija polifenola zahtjevnija je zbog značajne različitosti u kemijskoj strukturi te međusobnim interakcijama ili interakcijama s drugim skupinama spojeva. U biljnim tkivima polifenoli su najčešće prisutni u obliku glikozida pri čemu spojevi iz skupine flavonoida imaju vezanu molekulu šećera najčešće na C3, C5 ili C7 atomu, dok s proteinima mogu stvoriti polimerizirane derivate različite topljivosti. Njihove kemijske strukture i interakcije s drugim spojevima koji se mogu pronaći u hrani nisu u potpunosti poznati te je zato vrlo važan odabir dobrog otapala i uvjeta ekstrakcije. Polifenoli su osjetljivi na oksidaciju te visoke temperature i alkalna sredina mogu uzrokovati njihovu degradaciju zbog čega je potrebno optimirati uvjete ekstrakcije (Družynska i sur., 2007.).

Uvjeti ekstrakcije

Odvajanje topljivih polifenolnih spojeva iz biljaka može se provesti difuzijom čvrstog materijala (biljnog tkiva) koristeći otapalo koje je selektivno za ciljane skupine spojeva. Svaki biljni materijal ima određene specifičnosti koje mogu značajno utjecati na ekstrakciju polifenolnih spojeva (fizikalno kemijska svojstva ciljanih bioaktivnih spojeva, osjetljivost na toplinu, svjetlost, enzimsku i ne-enzimsku razgradnju, koncentraciju kisika itd.). Prema tome, važno je razviti optimalne metode ekstrakcije za kvantificiranje i identifikaciju polifenola (Takeuchi i sur., 2009.).

1. Otapalo

Pri odabiru otapala treba uzeti u obzir polarnost polifenola i samog otapala. Poznato je da su polarna otapala efikasnija u ekstrakciji polarnih tvari, a nepolarna otapala kod ekstrakcije nepolarnih tvari. Otapala kao što su metanol, etanol, aceton, etil acetat i njihove kombinacije koriste se za ekstrakciju polifenola iz biljnog materijala i često se miješaju s vodom u različitim omjerima. Odabirom pravog otapala utječe se na količinu i udjel ekstrahiranih polifenola (Dai i

Mumper, 2010.). Vodene smjese acetona dobra su otapala za polarne polifenole, ali njihova primjena može dovesti do neprihvatljivog udjela zaostalog acetona u ekstraktima. Također pokazalo se da se polifenoli s većom molekularnom masom bolje ekstrahiraju s vodenom otopinom acetona, a za ekstrakciju polifenola manje molekulske mase bolji je metanol. Međutim, oba otapala nisu našla veliku primjenu u prehrambenoj industriji zbog lošeg utjecaja na ljudsko zdravlje. Voda i etanol najčešće se koriste zbog svoje niske toksičnosti i visokog učinka ekstrakcije, s mogućnošću podešavanja polarnosti otapala miješanjem etanola i vode u različitim omjerima (Dent i sur., 2013.). Voda je univerzalno otapalo koje se koristi za izdvajanje biljnih metabolita iz ljekovitih biljnih vrsta. Iako je voda dobro otapalo za polifenole, učinak ekstrakcije vodenim otapalom je manji nego primjenom organskih otapala, dijelom zato što su polifenoli prisutni u biljnim tkivima često vezani za proteine i polisaharide vodikovim vezama i hidrofobnim vezama. Stoga dobro otapalo za ekstrakciju mora ne samo imati dobru moć otapanja, već također imati sposobnost cijepanja vodikovih veza. To je ujedno i razlog zašto se za ekstrakciju, kao otapala, obično koriste mješavine vode i organskih otapala (Miralai i sur., 2008). Osim vode, kao otapala u prehrambenoj industriji koriste se organska otapala i tekući plinovi. Ako se ekstrakti ljekovitih biljaka koriste za ljudsku upotrebu, primjena otapala za ekstrakciju propisana je posebnim zakonskim propisima. Prema Europskoj farmakopeji dopuštena su sljedeća otapala:

- voda (s dodatkom kiselina ili baza)
- prehrambeni proizvodi sa svojstvima otapala
- etanol

Pri korištenju vode i drugih prehrambenih proizvoda sa svojstvima otapala, pretpostavlja se da njihov zaostatak u ekstraktu nije štetan za ljude. Nasuprot tome, kod primjene industrijskih otapala definirani su maksimalni udjeli otapala koji smiju zaostati u ekstraktu (Bart, 2011.).

2. Vrijeme i temperatura ekstrakcije

Ovi parametri su također važni su za ekstrakciju te se moraju optimizirati jer efikasnost procesa uvelike ovisi upravo o temperaturi i vremenu. Povišene temperature ekstrakcije poboljšavaju učinkovitost procesa povećanjem topljivosti otopine i koeficijenta difuzije. Međutim, kod polifenolnih spojeva treba obratiti pozornost na njihovu stabilnost tijekom procesa jer polifenolni

spojevi, kod dugotrajnih ekstrakcija i visokih temperatura, lako hidroliziraju i dolazi do njihove toplinske razgradnje (oksidacije) te gubitka aktivnosti što rezultira smanjenim udjelom polifenola u ekstraktima. Na primjer, kod konvencionalnih metoda ekstrakcije antocijanina, ekstrakcija se obično provode na temperaturama u rasponu od 20 do 50°C jer je pri temperaturama većim od 70°C pokazano da uzrokuju brzu razgradnju antocijanina (Dai i Mumper, 2010.).

3. Veličina čestica i pH

Na udjel polifenola ekstrahiranog iz biljnog materijala bitno utječe i različita veličina čestica uzorka. Prijenos tvari iz biljaka može se poboljšati korištenjem manjih čestica radi poboljšanja prodiranja otapala u biljni materijal te povećanja brzine ekstrakcije polifenola i učinka ekstrakcije. Međutim, veličina čestica mora biti ograničena jer zbog izuzetno malih čestica, koje obično imaju tendenciju spojiti se u aglomerate, dolazi do smanjenja prodiranja otapala u biljni materijal, što negativno utječe na postupak prijenosa tvari (Takeuchi i sur., 2009.). Jedan od parametara koji može utjecati na efikasnost ekstrakcije je i pH vrijednost otapala. Za polifenole većina ekstrakcija izvode se u kiselim uvjetima, jer su općenito stabilniji u nižem pH području, a kiseli uvjeti pomažu polifenolima da ostanu neutralni te se tako lakše ekstrahiraju organskim otapalima.

2.3.2. Ekstrakcija ultrazvukom

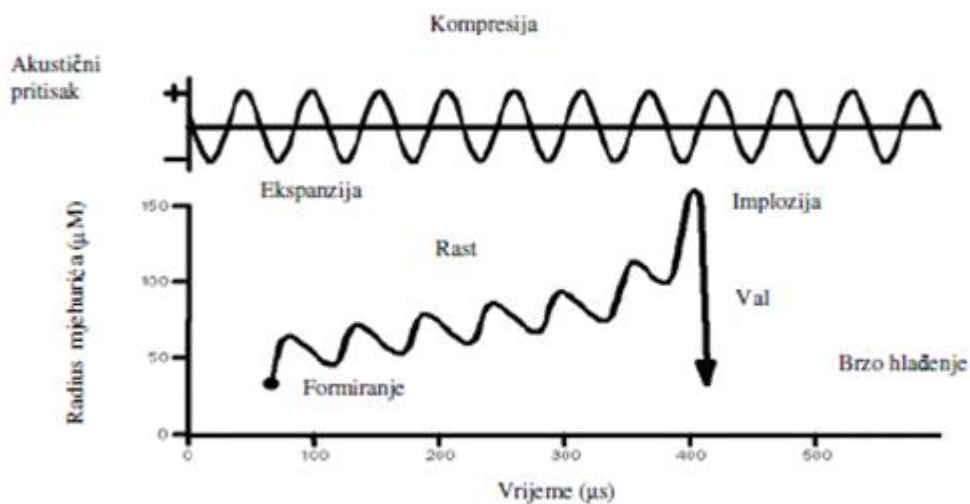
Djelovanjem ultrazvuka moguće je poboljšati bioraspoloživost mikronutrijenata zadržavajući pritom njihova izvorna svojstva. Također, moguće je izbjeći nastajanje slobodnih radikala, ali oni ponekad mogu biti korisni kod ciljane hidroksilacije polifenolnih i karotenoidnih spojeva čime se omogućuje povećanje njihove biološke aktivnosti (Ashokkumar i sur., 2008.).

Ako je primijenjena frekvencija visoka, govorimo o dijagnostičkom ultrazvuku niske energije, a ako je frekvencija niska, govorimo o ultrazvuku visoke energije. Dijagnostički ultrazvuk, tj. ultrazvuk niskog intenziteta (intenzitet manji od 1 W cm^{-2}) djeluje u frekvencijskom rasponu od 2 MHz na više (Mason i Luche, 1996.). On ne uzrokuje fizičke niti kemijske promjene u svojstvima medija na koji je primijenjen te se zato smatra neinvazivnom tehnikom, a koristi se kao analitička tehnika za kontrolu obrade hrane, mjerenja teksture, sastava (Povey i Mason, 1998; Režek Jambrak i sur., 2010.), viskoznosti, brzine protjecanja, kontrolu pakiranja, određivanja razine kapljevine u bačvama ili tankovima, koncentracije tvari u hrani itd. Ultrazvuk visokog intenziteta s rasponom frekvencija od 20 do 100 kHz (Povey i Mason, 1998, Villamiel i de Jong, 2000., Režek Jambrak i sur., 2010.) te visokih intenziteta (u rasponu od 1 do 1000 W cm^{-2}), može uzrokovati fizičke promjene materijala te određene kemijske reakcije u materijalima na kojima je primijenjen. Koristi se za čišćenje (Crawford, 1963.), otplinjavanje tekućina, homogenizaciju tekućina (Villamiel i de Jong, 2000.), sušenje, omekšavanje mesa, ekstrakciju, emulgiranje (Povey i Mason, 1998.), destilaciju, kristalizaciju (Mason i sur., 1996.), sterilizaciju itd.

2.3.2.1 Mehanizam i djelovanje ultrazvuka. Ultrazvuk visokog intenziteta može se stvoriti na različite načine, pokretanjem tekućine, mlazom plina ili pomoću električne snage (najčešće korišteno u prehrambenoj industriji). Generator pretvara napon istosmjerne struje u visoke frekvencije od cca. 25 kHz (25.000 ciklusa po sekundi) električne energije. Električna ili mehanička energija se pretvara u energiju zvuka pomoću ultrazvučnih pretvarača. Uslijed privlačenja polariziranih molekula dolazi do pojave mehaničkih vibracija koje se pojačavaju na pojačalu te se ultrazvučni valovi sandom emitiraju u medij. Prolaskom ultrazvučnog vala kroz medij dolazi do nastanka longitudinalnih valova, što pak dovodi do stvaranja područja promjenjivih kompresija i ekspanzija tlaka (Sala i sur., 1995.; Povey i Mason, 1998.). Dolazi do formiranja milijuna mikroskopskih mjehurića (šupljina), koji se proširuju pod utjecajem negativnog tlaka, a potom naglo implodiraju pod utjecajem pozitivnog tlaka. Ultrazvučne zrake

mogu biti usmjerene geometrijski; primjerice pomoću leća ili sa sfernim zakrivljenim sondama te elektroničkim putem; podešavanjem relativne faze elemenata u područje sonde ("faznom polju").

2.3.2.2. Kavitacija. Prilikom širenja zvučnog vala kroz tekući medij nastaju longitudinalni valovi što dovodi do izmjeničnih ciklusa kontrakcije i ekspanzije medija na koji se djeluje i ekspanzivnih vrtloga. Posljedica oscilacija tlaka su mjehurići koji osciliraju. Oni u fazi ekspanzije malo više narastu nego što se smanje tijekom faze kompresije (Suslick, 1990.). U trenutku kada mjehurić dosegne kritičnu veličinu gubi mogućnost apsorpcije energije, a bez ulazne energije šupljina se ne može samo održavati i mjehurić se urušava sam u sebe. Kritična veličina mjehurića uvjetovana je primijenjenom frekvencijom i medijem koji se tretira, npr. pri frekvenciji ultrazvuka od 20 kHz, kritična veličina je okvirno 170 μm (Suslick, 1994.). Kada energija ultrazvuka nije dovoljna da se zadrži plinska faza, u mjehuriću dolazi do brze kondenzacije, te se kondenzirane molekule sudaraju velikom brzinom, pri čemu nastaju udarni valovi. Takvi udarni valovi uzrokuju vrlo visoke temperature (do 5500 K) i tlakove (do 100 MPa) (Leighton, 2007.; Suslick, 1990.), što dovodi do mijenjanja fizikalno kemijskih svojstava lokalnih molekula.



Slika 8 Usporedba ciklusa kompresije i ekspanzije sa formiranjem, rastom i implozijom kavitacijskog mjehurića (Suslick, 1994.)

2.3.2.3. Ekstrakcija ultrazvukom. Metodom ultrazvučne ekstrakcije bioaktivnih spojeva nastoji se smanjiti uporaba ekstrakcijskih otapala ili ih potpuno izostaviti u samome postupku. Također, snižava se temperatura ekstrakcije, a povećavaju se prinosi procesa. Sam ultrazvuk omogućuje bolje prodiranje otapala u materijal, te bolji prijenos mase, dolazi do direktnog kontakta sadržaja stanice čija se stjenka razara i time se povećava učinkovitost ekstrakcije (Vinatoru, 2001.). Ekstrakcija bioaktivnih komponenti ultrazvukom (20-100 kHz) jedna je od novijih tehnika koje omogućuju visoku reproducibilnost u kraćem vremenu (Caili i sur., 2006.), jednostavnije rukovanje, niže temperature te korištenje manjih količina otapala (Chemat i sur., 2008.). Tijekom tretiranja ultrazvukom kavitacije uzrokuju bubrenje stanica te probijanje staničnih stjenki (Vinatoru, 2001.), što omogućuje visoku brzinu difuzije kroz staničnu stjenku te jednostavnije ispiranje sastojaka stanice. Uz otapalo i temperaturu, za optimiziranje procesa ekstrakcije i ostvarivanje maksimalnog prinosa ciljanih spojeva potrebno je dobro optimirati faktore ultrazvučnog tretiranja poput frekvencije, vremena tretiranja, snage ultrazvuka te distribucije ultrazvučnih valova (Wang i Weller, 2006.).

2.3.3. Mikrovalna ekstrakcija

Mikrovalovi su dio elektromagnetskog zračenja. Elektromagnetsko zračenje je gibanje energije i nastaje kao fizikalni fenomen protoka električne struje kroz vodič. Elektromagnetski valovi su titraji međusobno povezanog električnog i magnetskog polja, koji se šire prostorom. Protok struje kroz žicu rezultira stvaranjem dvaju polja, električnog i magnetskog, koja okružuju vodič, a promjena smjera gibanja struje (elektrona) uzrokuje pulsiranje oba polja i stvaranje elektromagnetnih valova koji se šire okomito na smjer struje koja ih je izazvala (Veggi i sur., 2013.).

2.3.3.1. Mehanizam mikrovalnog zagrijavanja. Mikrovalovi su oblik elektromagnetskog zračenja raspona valnih duljina od 1 mm do 300 mm, a frekvencija od 300 GHz do 1 GHz (Hrvatska enciklopedija IV, 2002.). Mikrovalovi se ne ubrajaju u ionizirajuće zračenje, jer njihova energija nije dovoljna za ionizaciju atoma. Prodiru u dielektrične materijale, u koje pripadaju i ljudska, životinjska i biljna tkiva. Pod utjecajem mikrovalova molekule u tkivu titraju, a tkivo se zagrijava. U hrani, mikrovalovi utječu na molekule vode, masti, šećera, te nekih drugih molekula. Mehanizam mikrovalnog zagrijavanja djeluje na dva simultana načina. Prvi je rotacija dipola uslijed djelovanja elektromagnetskog zračenja, a drugi je ionska vodljivost, tj. zamjena iona između rastvorene tvari i otapala (Favretto, 2004.). Rotacija dipola, tj. dipolnih

molekula se događa pod utjecajem elektromagnetskog zračenja, u ovom slučaju mikrovalova. Mikrovalovi svojim promjenjivim magnetskim svojstvima uzrokuju dipolno poravnanje, tj. zakretanje, a uslijed čega, zbog međusobnog trenja između molekula, dolazi do pretvaranja elektromagnetske energije u toplinsku. Ionska provodljivost je elektroforetska migracija iona pod djelovanjem elektromagnetskog polja, a otpor otopine tom toku iona uzrokuje trenje koje zagrijava otopinu. (Veggi i sur., 2013.).

2.3.3.2. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE). Mikrovalovima olakšana ekstrakcija (Microwave-assisted extraction, MAE) je metoda koja koristi energiju mikrovalova za zagrijavanje otapala s čvrstom tvari s ciljem izdvajanja komponenti uzorka u otapalo. Energija mikrovalova zagrije polarno otapalo u kontaktu s čvrstim uzorkom i na taj način smanjuje vrijeme ekstrakcije i količinu potrebnog otapala (Veggi i sur., 2013.). Metoda se često upotrebljava za analizu izuzetno malih količina organskih spojeva u čvrstim materijalima, tj. za ekstrakciju prirodnih spojeva poput polifenola iz biljnih materijala. Pomoću MAE je moguće dobiti udjele ekstrahiranih tvari slične onima dobivenim tradicionalnim, standardnim metodama, ali uz puno kraće vrijeme, što je zbog uštede na energiji (nema dodatnog zagrijavanja) ekonomski isplativo. MAE može i negativno djelovati na ekstrahirane tvari (bioaktivne spojeve uključujući polifenole) ako se temperatura otopine previše i/ili prebrzo povisi. U tom slučaju može doći do razgradnje polifenola ili do njihovog onečišćenja drugim, neželjenim komponentama biljnog materijala. Mikrovalna ekstrakcija je alternativa tradicionalnoj kruto - tekućoj ekstrakciji za ekstrakciju sekundarnih metabolita iz biljaka (Veggi i sur., 2013.) Parametri ekstrakcije ovise o tipu i osobinama otapala te tvari koja se podvrgava ekstrakciji. Zagrijavanje otopine ovisi o sposobnosti otapala da apsorbira mikrovalnu energiju i pretvori je u toplinu. Migracija otopljenih iona povećava prodiranje otapala u matriks čvrste tvari i tako potiče otapanje tvari koju želimo izolirati (Favretto, 2004.). Za MAE su se u prvim danima primjene koristile obične mikrovalne pećnice, koje su se koristile i u kućanstvima. S vremenom se upotreba mikrovalova širila i obuhvatila je i lako hlapiva i zapaljiva otapala što je potaknulo razvoj komercijalnih sustava za mikrovalovima olakšanu ekstrakciju. Dva su dostupna sustava. Prvi, za ekstrakciju pri kontroliranom tlaku i temperaturi koristi zatvorene posude (za niske ili visoke temperature ekstrakcije), a drugi mikrovalne ekstraktore pri atmosferskom tlaku. Tlak u ekstrakcijskim posudama ovisi o vrsti, količini i vrelištu otapala (Favretto, 2004.).

Na učinkovitost MAE utječe snaga mikrovalova, temperatura, vrijeme trajanja ekstrakcije i izbor otapala. Što je snaga ekstraktora veća, veća je i dostavljena elektromagnetska energija, a snaga je povezana s vremenom trajanja ekstrakcije (niža snaga/duže vrijeme i obratno, viša snaga/ kraće vrijeme ekstrakcije). Zbog tog razloga se biljni materijal ili dulje zrači mikrovalovima uz nisku do umjerenu snagu ili kratko vrijeme ako je snaga visoka. U slučaju kad je upotrijebljena snaga veća, postoji mogućnost pucanja biljnog materijala pa se željena tvar onečisti drugim komponentama (Veggi i sur., 2013.). Viša temperatura poboljšava difuziju otapala u unutrašnjost biljnog materijala i izdvajanje željenih komponenata. Tako se postiže bolji ekstrakcijski učinak, ali svaka tvar ima svoj gornju temperaturnu granicu. Ako se ta granica prekorači, dolazi do razgradnje (Veggi i sur., 2013.)

Odabir otapala ovisi o:

1. topljivosti ciljanih bioaktivnih komponenti
2. selektivnosti otapala prema toj tvari (ali ne i za ostale komponente)
3. sposobnosti otapala da prodre u i da stupi u interakciju sa matriksom čvrste tvari
4. dielektričnoj konstanti otapala
5. mogućnost dobrog upijanja energije mikrovalova

Najčešće se koriste otapala za klasičnu ekstrakciju (npr. etanol, metanol, voda itd.) Duža ekstrakcija znači i veću količinu ekstrahirane tvari, ali i veću mogućnost razgradnje. Zato je bitno odrediti optimalno vrijeme ekstrakcije. Na trajanje ekstrahiranja, isto kao i na druge parametre, utječu osobine biljnog materijala, tvari koja se ekstrahira i otapala (Favretto, 2004.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

U eksperimentalnom dijelu prikazano je istraživanje koje su proveli Otles i sur. (2012.)

3.1. MATERIJALI

3.1.1 Uzorci koprive

Uzorci su skupljeni s Egejskog, Crnog, Marmara i Sredozemnog mora. Nakon berbe uzorci su oprani i osušeni, te su odvojeni korijen, stabljika i listovi. Uzorci su pakirani u plastičnim vrećicama te čuvani na -20°C do provođenja analiza.

3.1.2 Priprema uzoraka i ekstrakcija

Dijelovi biljke su usitnjeni kako bi se pospješila ekstrakcija. Kao ekstrakcijsko sredstvo koristila se 80% vodena otopina metanola. Za analizu se odvagalo po 1 g svakog uzorka kojemu se doda 10 mL ekstrakcijskog sredstva te se ostavi u ekstraktoru na 1 h na temperaturi od 50°C. Ekstrakcija se odvijala u zatvorenom sustavu kako bi se izbjegao gubitak ekstrakcijskog sredstva. Nakon što je ekstrakcija završena eluat se filtrira.

3.1.3 Kemikalije i standardi

Kemikalije – Folin–Ciocalteu reagens (Sigma-Aldrich, E9252), octena kiselina (Panreac, 361008), natrijev karbonat (J.T. Baker, 2024), DPPH (2,2 difenil, 1, picrilhidrazil), kromatografski čisto otapalo metanola (Labscan, A17C11).

Standardi – galna kiselina (Sigma, G7384), ferulična kiselina (Fluka, 42280), rutin (Sigma, R5143), mirecitin (Sigma, M6760), sirinjična kiselina (Sigma, S6881), kafeinska kiselina (Sigma, C0625), klorogenska kiselina (Sigma, C3878), kvercitin hidrat (Sigma, 337951), p-kumarinska kiselina (Sigma, C9008), kampferol (Sigma, K0133), katehin hidrat (Fluka, 22110), fumarinska kiselina (Fluka, 47910), vanilinska kiselina (Fluka, 94770), naringin (Sigma, N1376), elaginska kiselina (Sigma, E2250), izoramnetin (Fluka, 17794).

3.2 METODE

3.2.1 Određivanje udjela vlage

Udio vlage se određivan je kako slijedi: Izvagano je 3 g ($\pm 0,001$ g) koprive svakog dijela biljke (korijen, stabljika, listovi) i stavljeno u prethodno izvagano i zagrijanu posudu za vaganje (1 h, $103 \pm 2^\circ\text{C}$) te sušeno 4 h, $103 \pm 2^\circ\text{C}$. Potom su stavljene na hlađenje u eksikatoru do sobne temperature, 30 min. Nakon što su ponovno izvagani, uzorci su ponovno stavljani 1 h na sušenje, taj postupak se ponavlja dok se ne dođe do konstantne mase.

Udio vlage se računao po sljedećoj formuli: $\% \text{ vlage} = \left[\frac{m_1 - m_2}{m_1} \right] \times 100$.

m_1 -početna masa uzorka prije sušenja (g)

m_2 -konačna masa uzorka nakon sušenja (g)

3.2.2 Određivanje ukupnog udijela fenolnih spojeva

Ukupni fenolni spojevi određivani su Folin-Ciocalteu metodom.

Princip metode:

Metoda se temelji na kolorimetrijskoj reakciji Folin-Ciocalteu reagensa s nekim reducirajućim reagensom (fenoli). Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibden kiseline, koja reagira s fenoksid ionom iz uzorka, prilikom čega se fenoksidion oksidira, a Folin-Ciocalteu reagens reducira do plavo obojenih volframovog i molibdenovog oksida (Singleton i sur., 1999.). Nakon dva sata reakcije u kojoj svi polifenolni spojevi izreagiraju s Folin-Ciocalteu reagensom, spektrofotometrijski se odredi intenzitet nastalog plavog obojenja na 765 nm (Ough i Amerine, 1988.). Očitavanje apsorbancije proporcionalno je intenzitetu proizašle plave boje i koncentraciji antioksidansa.

250 μL FC reagensa je dodano u 50 μL ekstrakta koprive te se nakon 5 min dodaje 750 μL 7% otopine Na_2CO_3 . Smjesa se nadopuni s 5mL deionizirane vode i ostavi na tamnom mjestu 120 min na sobnoj temperaturi kako bi se reakcija provela do kraja. U slijepu probu se umjesto 50

μL uzorka dodao isti volumen 80%-tne otopine metanola. Apsorbancija se mjerila na 760 nm, dok se ukupni udio fenola određivao iz baždarnog dijagrama te se izražavao kao ekvivalent galne kiseline mg/g suhe tvari.

3.2.3. Određivanje antioksidativnog kapaciteta DPPH metodom

Mjerenje antioksidativnog kapaciteta uzoraka koprive se provodilo korištenjem DPPH metode. $6 \times 10^{-5}\text{M}$ otopina DPPH je pripremljena pomoću čistog metanola. 2 μL otopine DPPH je dodano u 10 μL uzorka ili standardne otopine, te je ostavljeno na tamnom mjestu 20 min. Nakon toga se mjerila apsorbancija pri 515 nm. Čisti metanol je bio slijepa proba, a kao kontrolni uzorak se koristila 100 μL deionizirane vode umjesto uzorka. Antioksidativni kapacitet se određivao iz baždarnog dijagrama koji je dobiven uporabom različitih koncentracija otopine galne kiseline (10-100 ppm).

3.2.4. HPLC analiza fenolnih spojeva

Za analizu su uzeti metanolni ekstrakti uzoraka koprive koji su prethodno profiltrirani na mikro filteru (0,45 μm). Kvantitativno i kvalitativno određivanje fenolnih spojeva (kafeinske kiseline, vanilinske kiseline, naringina, siringinske kiseline, ferulinske kiseline, elaginske kiseline, miricetina, kampferola, izoramnetina, katehina, klorogenske kiseline, *p*-kumarinske kiseline, rutina i galne kiseline) u uzorcima koprive je provedeno HPLC analizom. Kao eluensi su se koristile otopine A i B; A se sastoji od 2% octene kiseline, 10% metanola i 88% deionizirane vode; B se sastoji od 2% octene kiseline, 90% metanola i 8% deionizirane vode. Koristio se gradijentni elucijski program; 0-11 min, 100% A; 30-40 min, 35% A i 65% B; 42 min, 100% B. Brzina protoka je iznosila 1 mL/min, temperatura je 40°C, injektirani volumen je bio 20 μL . Istovremeno se apsorbancija određivala pri valnim duljinama od 254, 270, 280 i 370 nm.

4. REZULTATI

Prikazani su rezultati za biljke nađene na Sredozemnom, Egejskom, Marmara i Crnom moru. U tablicama (1-5) su prikazani podatci o ukupnom udjelu vlage, ukupnim fenolima i polifenolnom sastavu te antioksidacijski kapacitet polifenolnih spojeva u cijeloj biljci te u listu i stabljici.

M01- uzorak biljke *U.dioica* sa Sredozemnog mora

A09 – uzorak biljke *U.dioica* s Egejskog mora

B52- uzorak biljke *U.dioica* sa Crnog mora

MS16- uzorak biljke *U.dioica* s Marmara mora

Tablica 1 Udio vlage, ukupni fenoli i antioksidacijski kapacitet u svježoj biljci *U.dioica*

Uzorak	Udio vlage (%)	Ukupni polifenoli (mgGAE/gDM)	DPPH (mgGAE/gDM)
M01	84,61±0,05	157,27±5,33	147,20±2,09
A09	88,84±0,18	113,69±2,8	145,83±0,39
B52	76,29±0,11	440,49±16,06	106,69±0,91
MS16	62,55±0,05	410,53±3,21	260,92±1,01

Tablica 2 Udio vlage, ukupni fenoli i antioksidacijska aktivnost u svježoj stabljici biljke *U.dioica*

Uzorak	Udio vlage (%)	Ukupni polifenoli (mgGAE/gDM)	DPPH (mgGAE/gDM)
M01	85,29±0,02	20,24±0,68	90,06±0,52
A09	91,17±0,30	60,71±1,34	50,77±0,15
B52	79,41±0,08	160,72±3,47	90,41±0,15
MS16	43,78±0,04	120,71±3,38	240,86±1,48

Tablica 3 Udio vlage, ukupni fenoli i antioksidacijska aktivnost u svježim listovima biljke *U.dioica*

Uzorak	Udio vlage (%)	Ukupni polifenoli (mgGAE/gDM)	DPPH (mgGAE/gDM)
M01	86,63±0,02	320,88±12,39	110,39±4,14
A09	84,04±0,04	190,01±4,74	320,38±0,89
B52	84,56±0,14	370,54±1,06	80,02±0,11
MS16	72,44±0,09	680,55±0,04	160,14±1,44

Tablica 4 Fenolni sastav svježih stabljika biljke *U.dioica*

Fenolni spojevi	M01	A09	B52	MS16
Galna kiselina	/	/	/	/
Siringinska kiselina	0,00±0,00	0,00±0,00	/	1,12±1,32
Miricetin	1,15±0,18	0,76±0,16	0,78±0,14	0,32±0,46
Kvercetin	0,72±0,01	0,75±0,01	0,74±0,03	0,73±0,01
Kampferol	0,24±0,24	0,44±0,01	0,63±0,26	/
Fumarinska kiselina	6,18±6,8	/	/	8,18±0,85
Vanilinska kiselina	/	0,00±0,00	/	/
Rutin	26,62±26,66	1,20±0,24	3,07±1,85	2,03±0,75
Elaginska kiselina	2,93±2,92	1,54±2,17	6,07±3,80	/
Izoramnetin	0,94±0,94	0,00±0,00	0,51±0,71	/
Katehin	/	/	/	/
Kafeinska+klorogenska kiselina	25,91±2,55	/	/	/
p-kumarinska kiselina	3,87±2,55	2,41±0,21	6,45±1,79	1,48±0,11
Ferulinska kiselina	20,82±1,37	6,45±1,79	5,53±0,00	0,86±1,21
Naringin	3,79±0,77	1,48±0,11	13,04±15,16	7,19±0,22

M01- uzorak biljke *U.dioica* sa Sredozemnog mora, **A09** – uzorak biljke *U.dioica* s Egejskog mora, **B52-** uzorak biljke *U.dioica* sa Crnog mora, **MS16-** uzorak biljke *U.dioica* s Marmara mora

Tablica 5 Fenolni sastav svježih listova biljke *U.dioica*

	M01	A09	B52	MS16
Galna kiselina	/	/	/	/
Siringinska kiselina	0,00±0,00	341,68±21,04	7,80±2,20	48,9±12,66
Miricetin	1,15±0,33	2,08±1,45	0,82±0,16	0,88±0,29
Kvercetin	0,96±0,13	1,19±0,42	1,30±0,27	0,96±0,20
Kampferol	0,61±0,15	1,68±0,03	0,97±0,76	0,85±0,32
Fumarinska kiselina	/	/	/	10,93±10,86
Vanilinska kiselina	26,15±36,98	40,68±10,78	/	/
Rutin	21,85±23,91	60,74±26,33	7,29±4,32	20,43±4,91
Elaginska kiselina	4,65±6,57	29,91±25,44	10,73±10,47	5,14±1,28
Izoramnetin	7,00±9,90	0,00±0,00	46,91±58,43	/
Katehin	/	/	/	/
Kafeinska+klorogenska kiselina	60,89±1,87	61,63±18,81	/	/
<i>p</i>-kumarinska kiselina	3,34±0,01	2,94±0,9	4,70±1,68	1,54±0,37
Ferulinska kiselina	1,66±1,02	20,36±1,76	2,54±0,05	2,43±3,43
Naringin	7,35±2,78	34,04±13,58	4,05±1,03	10,24±0,57

M01- uzorak biljke *U.dioica* sa Sredozemnog mora, **A09** – uzorak biljke *U.dioica* s Egejskog mora, **B52-** uzorak biljke *U.dioica* sa Crnog mora, **MS16-** uzorak biljke *U.dioica* s Marmara mora

5. RASPRAVA

Istraživanje je provedeno na uzorcima koprive s različitih područja uzgoja (Sredozemno, Egejsko, Marmara i Crno more) te na različitim dijelovima koprive - cijeloj biljci te u listu i stabljici. Rezultati određivanja udjela vlage su prikazani u tablicama (1-3). Udio vlage u cijeloj biljci značajno je varirao ovisno o području uzgoja koprive. Prosječan udio vlage u cijeloj biljci iznosio je 80,94%, u stabljici 83,11% te 77,75% u listovima. Najniži udio vlage su imali uzorci biljke *U.dioica* s Marmara mora; $62,55 \pm 0,05\%$ u cijeloj biljci, $72,44 \pm 0,09\%$ u listu te $43,78 \pm 0,04\%$ u stabljici, dok su najviši udio vlage imali uzorci biljke i stabljike s Egejskog mora ($88,84 \pm 0,18\%$ te $91,17 \pm 0,30\%$), a u listu uzorci biljke sa Sredozemnog mora ($86,63 \pm 0,02\%$). Uzorci koji su sadržavali niži udio vlage imali su veći udio ukupnih fenola; $440,49 \pm 16,06$ mgGAE/gDM u cijeloj biljci i $160,72 \pm 3,47$ mgGAE/gDM u stabljici koprive sa Crnog mora, dok listovi biljaka s Marmara mora sadrže $680,55 \pm 0,04$ mgGAE/gDM.

Antioksidacijski kapacitet nije bio u skladu s udjelom fenolnih spojeva. Utvrđeno je da uzorci koji su sadržavali veći udio fenola nemaju najviši antioksidacijski kapacitet. Najveći antioksidacijski kapacitet su imali uzorci stabljike ($240,86 \pm 1,48$ mgGAE/gDM) i biljke ($260,92 \pm 1,01$ mgGAE/gDM.) s Marmara mora, a u listu s Egejskog mora ($320,38 \pm 0,89$ mgGAE/gDM). To upućuje na pretpostavku da i ostali bioaktivni spojevi koprive doprinose antioksidacijskom kapacitetu (Ashokkumar i sur., 2008.).

U svježim stabljikama i listovima koprive sastav polifenola je određen kvantitativno i kvalitativno tekućiskom kromatografijom visoke djelotvornosti.

Uzorci stabljika sa svih područja uzgoja sadržavali su sljedeće fenolne spojeve od kojih su fenolne kiseline: *p*-kumarinska i ferulinska kiselina, te flavonoidi: miricetin, kvercetin, rutin i naringin. Siringinska kiselina je pronađena u uzorcima s Marmara mora, fumarinska je pronađena u uzorcima sa Sredozemnog i Marmara mora, također u uzorcima sa Sredozemnog mora pronađene su klorogenska i kafeinska kiselina. Kampferol je pronađen u stabljikama biljke uzgajane na Sredozemnom, Egejskom i Crnom moru, dok je izoramnetin pronađen u uzorcima sa Sredozemnog i Crnog mora. Od fenolnih kiselina u stabljici prevladavaju kafeinska, klorogenska i ferulinska i to u uzorcima sa Sredozemnog mora, dok od flavonoida dominiraju; rutin u uzorcima sa Sredozemnog mora te naringin u uzorcima s Crnog mora.

Listovi koprive sa svih područja uzgoja sadržavali su sljedeće fenolne spojeve od kojih su fenolne kiseline: siringinska, elaginska, *p*-kumarinska i ferulinska kiselina, te flavonoidi: miricetin, kvercetin, kampferol, rutin i naringin. Fumarinska kiselina nađena je u listovima koprive s Marmara mora, a vanilinska, klorogenska i kafeinska u uzorcima sa Sredozemnog i Egejskog mora. Izoramnetin je pronađen samo u listovima biljaka sa Sredozemnog i Crnog mora. Od fenolnih kiselina u listovima koprive dominiraju siringinska kiselina (Egejsko i Marmara more), kafeinska i klorogenska (Sredozemno i Egejsko more) te vanilinska kiselina (Egejsko more).

6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja, dobivenih rezultata i rasprave može se zaključiti:

1. Prosječan udio vlage u cijeloj biljci iznosio je 80,94%, u stabljici 83,11% te 77,75% u listovima.
2. Uzorci koji su sadržavali niži udio vlage imali su veći udio ukupnih fenola. $440,49 \pm 16,06$ mgGAE/gDM u cijeloj biljci i $160,72 \pm 3,47$ mgGAE/gDM u stabljici koprive sa Crnog mora, dok listovi biljaka s Marmara mora sadrže $680,55 \pm 0,04$ mgGAE/gDM.
3. U stabljici su određene fenolne kiseline: *p*-kumarinska i ferulinska kiselina, te flavonoidi: miricetin, kvercetin, rutin i naringin. Listovi koprive su sadržavali su slijedeće fenolne spojeve: fenolne kiseline- siringinska, elaginska, *p*-kumarinska i ferulinska kiselina, te flavonoide- miricetin, kvercetin, kampferol, rutin i naringin.
4. Utvrđeno je da uzorci koji su sadržavali veći udio fenola nemaju najviši antioksidacijski kapacitet.

7. LITERATURA

- Asgarpanah, J., Mohajerani, R. (2012) Phytochemistry and pharmacologic properties of *Urtica dioica* L. *J. Med. Plants Res.* 6, 46: 5714-5719.
- Ashokkumar, M., Sunartio, D., Kentish, S., Mawson, R., Simons, L., Vilku, K., Versteeg, C. (2008) Modification of food ingredients by ultrasound to improve functionality: A preliminary study on a model system. *Innov. Food Sci. & Emerg. Technol.* 9: 155-160.
- Barbosa, A.D., Osório, H., Sims, K.J., Almeida, T., Alves, M., Bielawski, J., Amorim, M.A., Moradas-Ferreira, P., Hannun, Y.A., Costa, V. (2011) Role for Sit4p-dependent mitochondrial dysfunction in mediating the shortened chronological lifespan and oxidative stress sensitivity of Isc1p-deficient cells. *Mol. Microbiol.* 81:515-27
- Bart, H.-J. (2011) Extraction of natural products from plants – an introduction. U: Industrial scale natural products extraction, (Bart, H.-J., Pilz S., ured.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, str. 1-25.
- Bhuwan, C.J., Minky, M., Ajudhia, N.K.(2014) Pharmacognostical review of *Urtica dioica* L. *Int J Green Pharm.* 8:201-9.
- Bucar, F., Britzmann, B., Streit, B., Weigend, M. (2006). LC-PDA-MS-profiles of phenolic compounds in extracts aerial parts of *Urtica* species. *Planta Med.* 72:152.
- Caili, F., Haijun, T., Quanhong, L., Tongyi, C., Wenjuan, D. (2006): Ultrasound assisted extraction of xyloglucan from apple pomace, *Ultrason. Sonochem.* 13, 511-516.
- Chemat, F., Tomao, V., Viot, M. (2008): Ultrasound assisted extraction in food analysis. In: Handbook of food analysis instruments, Boca Raton, Florida, USA, Semih Ötles, pp. 85-103.
- Crawford, A.E. (1963): A practical introduction to ultrasonic cleaning, *Ultrasonics* 1, 65.
- Dai, J., Mumper, R.J. (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15, 7313-7352.
- Dent, M., Dragović-Uzelac, V., Penić, M., Brnčić, M., Bosiljkov, T., Levaj, B. (2013) The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in Dalmatian wild sage (*Salvia officinalis* L.) extracts. *Food Technol. Biotechnol.* 51, 84-91.
- Drużyńska, B., Stepniewska, A., Wołosiak, R. (2007) The influence of time and type of solvent on efficiency of the extraction of polyphenols from green tea and antioxidant properties obtained extracts. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 6, 27-36.

- Ellnain Wojtaszek, M., Bylka, W., Kowalewski, Z. (1986) Flavanoids compounds in *Urtica dioica* L. *Herba Pol.* 32:131-7.
- Favretto, L. (2004) Basic Guidelines for Microwave Organic Chemistry Applications, Milestone, Bergamo
- Ferruzzi, M. G., Bohm, V., Courtney, P. D., Schwartz, S. J. (2002) Antioxidant and antimutagenic activity of dietary chlorophyll derivatives determined by radical scavenging and bacterial reverse mutagenesis assays. *J. Food Sci.* 67, 2589-2595.
- Fiedor, J., Burda, K., (2014) Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease, *Nutrients.* 6: 466–488.
- Greenberg, M.I. (2003). Occupational, industrial, and environmental toxicology. Elsevier Health Sci. p.180.
- Grlić, Lj. (1990.) Enciklopedija samoniklog jestivog bilja, 2.izd., August Cesarec, Zagreb
- Gulcin, I., Küfrevioglu, O.I., Oktay M., Büyükokuroglu, M.E. (2004). Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *J. Ethnopharmacol.* 90:205-215.
- Hrvatska enciklopedija IV. svezak Fr- Ht (2002) Leksikografski zavod Miroslav Krleža, Zagreb
- Kazazić, P.S. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. Arhiv za higijenu rada i toksikologiju 55, 279-290.
- Khouri, N.A., El-Akawi, Z. (2005) Antiandrogenic activity of *Ruta graveolens* L in male Albino rats with emphasis on sexual and aggressive behavior *Neuro Endocrinol Lett.* 26:823-9.
- Koch, E. (2001). Extracts from fruits of saw palmetto (*Sabal serrulata*) and roots of stinging nettle (*Urtica dioica*): Viable alternatives in the medical treatment of benign prostatic hyperplasia and associated lower urinary tracts symptoms. *Planta Med.* 67:489-500.
- Krystofova, O., Adam, V., Babula, P., Zehnalek, J., Beklova, M., Havel, L., Kizek, R. (2010) Effects of various doses of selenite on stinging nettle (*Urtica dioica* L .) *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 7:3804–3815.
- Kumar, S., Pandey, A. K. (2013) Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Sci. World J.* 1-16.
- Leighton, T. G. (2007): What is ultrasound?, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 93, 3–83.

- Liu, R.H., (2004) Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J Nutr.* 134, 3479S-3485S.
- Macheix, J.J., Fleureit, A., Billot, J. (1990) Fruit Phenolics, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Mason, T.J., Luche, J.L. (1996): Ultrasound as a new tool for synthetic chemists. In: Chemistry under extreme or non classical conditions, van Eldk, R., Hubbard, C.D., (ed.), John Wiley and sons, Inc. and Spektrum Akademischer Verlag, New York., pp. 317-380.
- Mavi, A., Terzi Z., Ozgen U., Yildirim, A., Coskun, M. (2004). Antioxidant properties of some medicinal plants: *Prangos ferulacea* (Apiaceae), *Sedum sempervivoides* (Crassulaceae), *Malva neglecta* (Malvaceae), *Cruciata taurica* (Rubiaceae), *Rosa pimpinellifolia* (Rosaceae), *Galium verum* subsp. verum (Rubiaceae), *Urtica dioica* (Urticaceae). *Biol. Pharm. Bull.* 27:702-705.
- Meepagala, K.M., Schrader, K.K., Wedge, D.E., Duke, S.O.(2005) Algicidal and antifungal compounds from the roots of *Ruta graveolens* and synthesis of their analogs. *Phytochemistry*. 66:2689-95.
- Miralai, S., Khan, M.M., Islam, M.R. (2007) Replacing artificial additives with natural alternatives. *J. Nat. Sci. Technol.* 1, 403-434.
- Naczki, M., Shahidi, F. (2006) Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *J. Pharmaceut. Biomed.* 41, 1523–1542.
- Oliver, F., Amon, E.U., Breathnach, A., Francis, D.M., Sarathchandra, P., Kobza Black, A., Greaves, M.W. (1991). Contact urticaria due to the common stinging nettle (*Urtica dioica*)-histological, ultrastructural and pharmacological studies. *Clin. Exp. Dermatol.* 16:1-7.
- Otles, S., Yalcin, B. (2012) Phenolic compounds analysis of root, stalk, and leaves of nettle. *Sci. World J.*, 1-12
- Povey, M.J.W., Mason, T.J. (1998): Ultrasound in Food Processing, Blackie Academic and Professional, London.
- Režek Jambrak, A., Lelas, V., Herceg, Z., Badanjak, M., Werner, Z. (2010): Primjena ultrazvuka visoke snage u sušenju voća i povrća, *Kem. Ind.* 59, 169–177.
- Robards, K., Prenzler, P.D., Tucke, G., Swatsitang, P., Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* 66: 401–436.

- Sala, F.J., Burgos, J., Condon, S., Lopez, P., Raso, J. (1995): Effect of heat and ultrasound on microorganisms and enzymes. In: New methods of Food Preservation. Gould, G.W. (ed.), Blackie Academic and Professional: London.
- Suslick, K. (1990): Sonochemistry, *Science* 247, 1439-1445.
- Suslick, K.S. (1994): The chemistry of ultrasound. In: The Yearbook of Science and the Future 1994; Encyclopaedia Britannica: Chicago, pp. 138-155.
- Taiz, L., Zeiger, E. (1998) Stress Physiology. U: Plant Physiology (Bressan, R.A., Lacy R.B., ured.), Sinauer Associates, Sunderland, str. 591-614.
- Takeuchi, T.M., Pereira, C.G., Braga, M.E.M., Maróstica, M.R. Jr., Leal, P.F., Meireles, M.A.A. (2009) Low-pressure solvent extraction (solid–liquid extraction, microwave assisted, and ultrasound assisted) from condimentary plants. U: Extracting bioactive compounds from food products (Meireles, M. A.A., ured.), Crc press, Taylor& Francis group, New york, str. 137-218.
- Tsao, R. (2010) Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients* 2, 1231-1246.
- Veggi, P.C., Martinez, J., Meireles, M.A.A. (2013) Fundamentals of Microwave Extraction. U: Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds Theory and Practice (Chemat, F., Cravotto G., ured.), Springer Science+Business Media, New York, str. 15-52.
- Villamiel, M., de Jong, P. (2000): Influence of high intensity ultrasound and heat treatment in continuous flow on fat, proteins, and native enzymes of milk, *J. Agric. Food. Chem.* 48, 472-478.
- Vinatoru, M. (2001): An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs, *Ultrason. Sonochem.* 8, 303-313.
- Von Wettstein, D., Gough, S., Kannangara, C. (1995) Chlorophyll Biosynthesis. *Plant Cell* 7(7), 1039–1057
- Wang, L., Weller C.L. (2006): Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, *Trends. Food. Sci. Tech.* 17, 300-312.
- Willows, R. D. (2004) Chlorophylls. U: Plant Pigments and their Manipulation (Davies, Kured.), Blackwell Publishing, Oxford, str. 23-56.
- Zargari, A. (1988). Medicinal plants. Vol 2. Tehran University Press, Iran: 42.